상악동암에서 Sulindac Sulfide에 의한 세포소멸 기전

가천대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실,[1] 두뇌한국21 의과학 사업단,[2]
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실[3]
김동영[1] · 송경섭[2] · 문인석[3] · 윤주헌[2,3]

Sulindac Sulfide-induced Apoptosis is Caspase 3-Dependent in Maxillary Cancer Cells

Dong Young Kim, MD[1], Kyoung Seob Song[2], In Seok Moon, MD[3] and Joo-Heon Yoon MD[2,3]

[1]Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Gil Medical Center, Gachon Medical College, Incheon; and [2]BK21 Project for Medical Science, Seoul; and [3]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Head and neck cancer is the sixth most common cancer in human body. Squamous cell cancer (SCC) accounts for most of sinonasal cancers. Prediction of cancer development and induction of cell death are thought to account for the conquest of maxillary sinus cancer. Little is known about its biochemical mechanism(s) of cell death. Recently, human epidemiological and clinical intervention indicate that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and the cyclooxygenase (COX) inhibitor have chemopreventive activity against colorectal cancer. We examined what kind of NSAIDs induce death of maxillary sinus cancer cells. **Materials and Method** : Human maxillary sinus cancer cells were treated with NSAIDs. The NSAIDs-induced cell death was measured by Flow cytometry (FACS). To know whether sulindac sulfide-induced cell death is apoptosis or necrosis, we carried out Western blot analysis using anti-poly ADP-ribosyl polymerase (PARP) IgG and caspase 3 assay. We also measured cell survival rate using general caspases inhibitor, Z-VAD-fmk. **Results** : Treatment of human maxillary sinus cancer cells with sulindac sulfide resulted in a dose-dependent cell death, and induction of apoptosis. General caspases inhibitor, Z-VAD-fmk potentiated the apoptosis inhibitory effect of sulindac sulfide. **Conclusion** : These results suggest that the inhibition of caspases is responsible for a part of the induction of apoptosis by sulindac sulfide. Inhibition of caspase 3 activity may, therefore, be a useful biochemical target for the development of chemopreventive and chemotherapeutic drugs for maxillary sinus cancer. **(Korean J Otolaryngol 2002;45:1157-61)**

KEY WORDS : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs · Sulindac · Apoptosis · Caspases.

서 론

상악동암은 부비동에서 가장 흔한 암 종이며, 이 중 대부분이 편평상피암종이나,[1)] 그 발암기전이나 세포소멸의 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 지금까지 상악동암종의 치료는 외과적 절제와 술후 방사선치료가 가장 효과적인 것으로 알려져 있다.[2)] 이러한 외과적 절제와 방사선치료에도 불구하고 5년 생존율은 40~50%로 보고되어 있어,[2)] 환자의 생존율을 높이기 위해서는 새로운 치료법 혹은 약제의 개발이 절실하다.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)는 cyclooxygenase(COX) 1과 2의 억제제로 알려져 있다.[3)] COX-1과 COX-2는 아라키돈산에서 프로스타그라딘의 형성에 관여하며, COX-1은 세포 내에서 항상 발현하고, COX-2는 어떠한 자극이 주어질 때만 발현한다.[3)] 현재까지의 많은 연구들은 NSAIDs가 대장암에서 암세포 사멸을 유도한다고 보고하고 있고,[3-5)] 또한 최근에는 NSAIDs가 폐, 식도, 위 등의 암세포 증식억제에도 효과가 있다고 보고되고 있다.[6)] 그러나 상악동암종에서 어떠한 NSAIDs가 상악동암세포의 세포소멸을 유도할 수 있는지는 아직 밝혀져 있지 않다. NSAIDs가 암억제제로서의 중요한 임상적 기능이 보고되어 있음에도 불구하고, 분자생물학적이나 생화학적인 기전은 아직까지 정확히 규명되어 있지 않다.

논문접수일 : 2002년 8월 8일 / 심사완료일 : 2002년 10월 1일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02)361-8484 · 전송 : (02)361-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

이에 저자들은 첫째, 어떠한 NSAIDs가 상악동암 세포에서 세포사멸을 유도하는지를 밝히고, 둘째, 세포사멸이 세포소멸 인지를 조사하며, 셋째, 만일 sulindac sulfide에 의한 세포소멸이라면 세포소멸을 유발시키는 cascade caspase들과의 관계가 있는 지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

Propidium iodide(PI), sulindac sulfide, indomethacin, Acetaminophenol, Diclofenac, Ibuprofen, Aspirin은 Sigma 사(St. Louis, MO)에서 구입하였고, Z-VAD-fmk와 caspase 3 분석 키트는 Promega 사(Madison, WI)에서 구입하였다. Anti-Activated-PARP 항체는 Cell Signaling 사(Beverly, MA)에서 구입하였고, anti-α-tubulin 항체는 Calbiochem 사(San Diego, CA)에서 구입하였다.

세포배양

상악동암 세포(HN5 cells, 서울아산병원 김상윤 제공)는 DMEM 배지(GIBCO BRL ; Rockville, MD)에 10% 혈청(FBS ; GIBCO BRL)을 첨가하여 37℃ 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

NSAIDs 처치 후 세포사멸 분석

어떤 NSAIDs가 상악동암 세포에서 세포소멸을 유도하는지 알아보기 위하여, Sulindac sulfide, indomethacin, Acetaminophenol, Diclofenac, Ibuprofen, Aspirin을 처치 후 24시간 뒤 FACS를 이용하여 세포소멸을 분석하였다. 상악동암 세포인 HN5 세포를 5×10^5/35 mm plate에 plating 한 후 DMEM과 10% FBS를 이용하여 5% CO_2 배양기에서 키웠다. 1×10^6개의 세포가 되면 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 후 그 다음 날 sulindac sulfide, indomethacin, acetaminophenol, diclofenac, ibuprofen, aspirin을 처치했다. 24시간 후 floating 세포까지 전부 채취하여 Fluorescence activated cell scan(FACS) tube(Falcon ; Franklin Lakes, NJ)에 옮긴 후 남아있는 세포들은 trypsin을 이용하여 plate에서 분리하여 FACS tube에 옮겼다. 원심분리(800 × g, 5분)후 propidium iodide를 첨가한 후 FACS 기기(Applied Biosystems 사 ; Foster City, CA)를 이용하여 PI가 들어간 죽은 세포를 측정하였고, Cell Quest software(Applied Biosystems 사 ; Foster City, CA)를 사용하여 수치화 하였다. 각 실험 결과는 3번 반복 실험하여 평균값과 표준편차로 나타내었다.

Western blot 분석

Sulindac sulfide에 의한 세포사멸이 세포소멸인지 세포고사(necrosis) 인지를 알아보기 위하여 세포소멸의 중요한 marker인 poly ADP-ribosyl polymerase(PARP)를 western blot 분석으로 조사하였다. NSAIDs를 처치 24시간 후 floating 세포까지 전부 채취하여 microtube에 옮긴 후 나머지 세포는 lysis buffer[250 mM Tris-Cl(pH 6.5), 2% SDS, 4%-mercaptoethanol, 0.02% BPB, 10% Glycerol]를 넣어 세포를 깨고, 10~15% poly acrylamide gel를 이용하여 분리하였다. Polyvinylidene difluoride membrane(PVDF ; Millipore, Bedford, MA)으로 옮긴 후 5% 탈지분유를 이용하여 비특이적 반응을 막은 후 TBS-T[50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20] 완충액에 α-activated PARP IgG와 α-α-tubulin IgG를 1 : 1,000~1 : 3,000 비율로 넣은 후 12시간 정도 상온에서 결합시켰다. TBS-T 완충액으로 5분씩 세번 세척 한 후 다시 TBS-T에 이차항체인 Horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG과 anti-mouse IgG를 1 : 3,000 비율로 넣은 후 상온에서 한 시간 반응시킨 후 화학발광(ECL ; Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ)으로 발색하여 X-선 필름에 감광시켰다.

Caspase general 억제제인 Z-VAD-fmk를 이용한 세포소멸분석

상악동암 세포에서 PARP의 절단이 caspase에 의존적인지를 알아보기 위하여 caspase 억제제인 Z-VAD-fmk를 이용하여, FACS로 세포소멸을 분석을 하였다. 1×10^6개의 세포가 되면 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 후 그 다음 날 Z-VAD-fmk를 0.2% DMEM에 섞은 후 처치 한 후 2시간 뒤에 NSAID를 처치하였다. 24시간 뒤 FACS 분석하였다.

Caspase 3 분석

0.2% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 후 그 다음 날 Z-VAD-fmk를 0.2% DMEM에 섞은 후 처치 한 후 2시간 뒤에 NSAID를 처치하였다. Trypsin을 이용하여 harvest하여 4℃에서 450 × g로 10분간 원심분리 하였다. 얼음에 15분간 방치한 다음 4℃ 15,000 × g 20분간 원심분리 함으로써 분리하였다. Ac-Asp-Glu-Val-Asp-pNA 기질을 넣고 37℃에서 4시간 결합시켰다. 405 nm에서 caspase 활성을 ELISA reader를 이용하여 측정하였다. 각 실험 결과는 3번 반복 실험하여 평균값과 표준편차로 나타내었다.

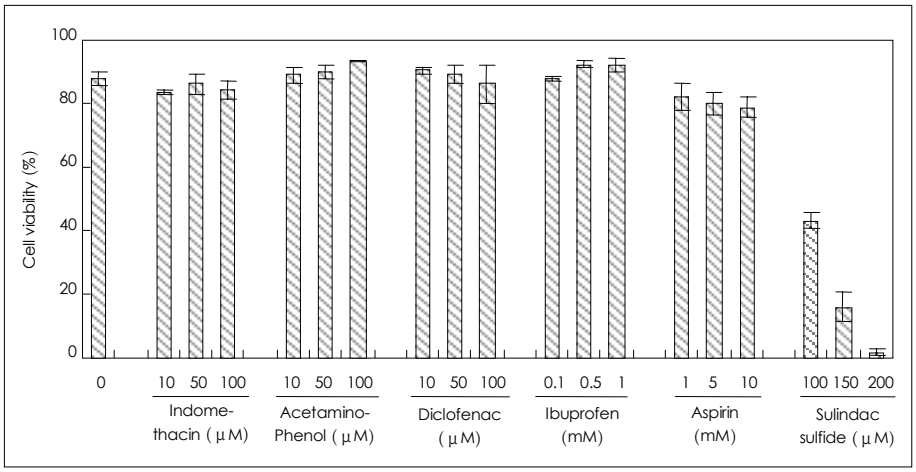

Fig. 1. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs-induced cell death in HN5 cells. Maxillary cancer cells, HN5, were treated with NSAIDs for 24 hours and cells were harvested for FACS using PI. The figures shown are representative of three independent experiments.

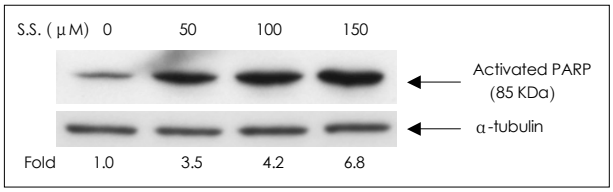

Fig. 2. Sulindac sulfide-induced apoptosis. Maxillary cancer cells, HN5, were treated for 24 hrs with the indicated concentration (μM) of sulindac sulfide. Cells were harvested and lysed and then total proteins were collected for Western blot analysis. Anti-activated PARP antibody did not react with full length PARP. α-tubulin was employed as an internal control. The activities were indicated after correction for the same amount using the α-tubulin of the cell lysates to standardize the values. The figures shown are representative of three independent experiments.

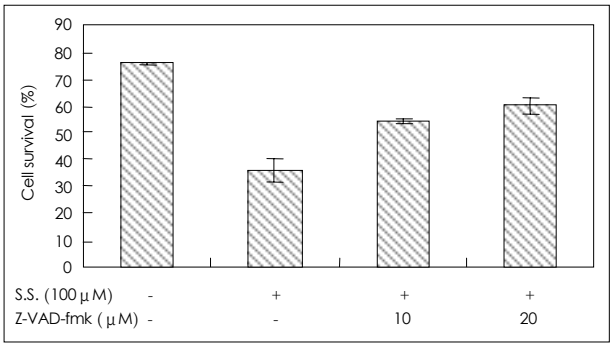

Fig. 3. Sulindac sulfide-induced capase-dependent apoptosis. Cells were pretreated for 2 hrs with the indicated concentration (μM) of Z-VAD-fmk and then stimulated for 24 hrs with sulindac sulfide prior to collection for FACS. The figures shown are representative of three independent experiments.

결 과

Sulindac sulfide를 제외한 indomethacin, Acetaminophenol, Diclofenac, Ibuprofen, Aspirin 등은 상악동암 세포소멸을 유도하지 못하였고, sulindac sulfide에 의해 농도증가에 의존적으로 사멸되었다(Fig. 1).

PARP는 116 Kda으로 존재하다가 세포소멸 신호가 전달되면 85 Kda과 16 Kda으로 잘라지고[7] 활성화된 PARP는 85 Kda으로 존재한다. Sulindac sulfide를 농도 별로 24시간 처치하고, anti-activated PARP 항체로 Western blot 분석하였다. Sulindac sulfide의 농도가 증가됨에 따라 활성화된 PARP가 증가되었다(Fig. 2).

Caspase 억제제인 Z-VAD-fmk를 전 처치 후 sulindac sulfide를 처치하였을 때, Z-VAD-fmk 농도 증가에 따라 의존적으로 세포소멸이 감소함을 관찰하였다(Fig. 3). 또한 Z-VAD-fmk를 전 처치하고 sulindac sulfide를 처치하면 PARP의 절단이 억제되었다(Fig. 4).

Caspase 중에서 effect caspase로 알려진 caspase 3에 의존적인지를 알기 위하여 caspase 3 분석을 하였다.[8]

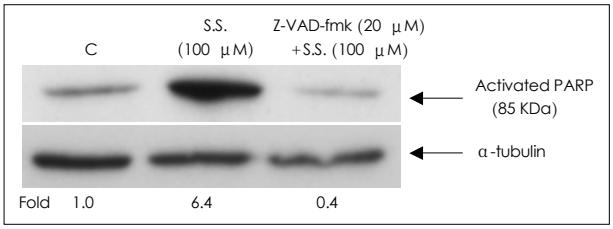

Fig. 4. Effects of Z-VAD-fmk on sulindac sulfide-induced activation of PARP. Cells were pretreated for 2 hrs with 20 μM of Z-VAD-fmk and then stimulated for 24 hrs with sulindac sulfide prior to collection of total proteins for Western blot analysis. α-tubulin was employed as an internal control. The activities were indicated after correction for the same amount using the α-tubulin of the cell lysates to standardize the values. The figures shown are representative of three independent experiments.

Sulindac sulfide를 처치한 상악동암 세포에서 caspase 3의 효소활성은 caspase 3의 화학적으로 형광물질이 합성된 기질(Ac-DEVD-pNA)을 사용하여 405 nm에서 측정하였다. Sulindac sulfide를 처치한 군에서는 활성도가 높은 반면 Z-VAD-fmk를 전처치하고 sulindac sulfide를 처치후에는 급격히 활성도가 떨어졌다(Fig. 5).

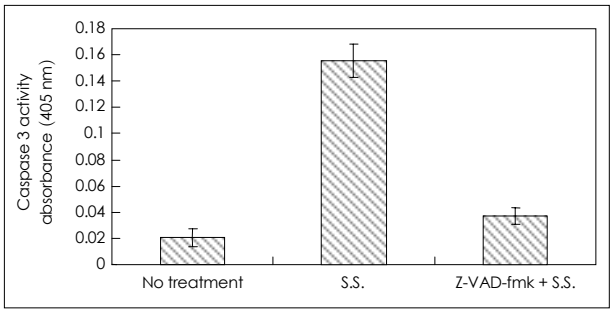

Fig. 5. Sulindac sulfide-induced capase 3-dependent apoptosis. Cells were pretreated for 2 hrs with 20 μM Z-VAD-fmk and then stimulated for 24 hrs with sulindac sulfide prior to collection for Caspase 3 analysis. Cell extracts were tested for caspase 3 activity according to conditions described in "Materials and method". The figures shown are representative of three independent experiments.

고 찰

NSAIDs 중에서 항암특성을 가진 sulindac sulfide는 실험관에서 세포소멸과 성장억제를 유도하는 것으로 알려졌으나,[6] sulindac sulfide에 의한 세포소멸의 생화학적 기전은 충분히 알려져 있지 않다. NSAIDs 중 sulindac은 인체에서 대사되어 sulindac sulfide와 sulindac sulfone으로 나누어지며, sulindac sulfide는 선택적 COX 억제제인데 반해 sulindac sulfone은 COX 억제 활성이 없다고 알려져 있다.[6] 그러나 기전이 다름에도 불구하고 sulindac sulfide와 sulindac sulfone은 여러 암세포에서 세포소멸을 유도한다고 보고되고 있다.[6)9-11]

본 연구의 주요 발견은 indomethacin, acetaminophenol, diclofenac, ibuprofen, aspirin보다 sulindac sulfide가 강력하게 상악동암의 세포소멸을 유도한다는 것이다. 대장암, 유방암 및 전립선암 종에서는 NSAIDs의 항암효과는 보고되었지만, 상악동암에서의 항암효과는 지금까지 보고되어 있지 않았다. 또한 NSAIDs는 COX의 억제제로 알려져 있지만 상악동암에서는 sulindac sulfide에 의해 COX-2가 조절 받지 않았다.(data not shown). 이러한 결과는 상악동암 세포에서 sulindac sulfide에 의한 세포사멸은 COX-2와 무관하게 암세포 사멸을 야기한다는 것을 의미한다. 최근에 Baek 등은 NSAIDs에 의해 조절받는 NSAID-activated gene 1(NAG-1)은 대장암세포에서 proapoptotic과 antitumorigenic 효과가 있다고 보고하였다.[12)13)] 그러나 상악동암 세포에서는 sulindac sulfide에 의해 NAG-1의 발현에 영향을 주지 않았다(data not shown). 이러한 결과들은 sulindac sulfide에 의한 세포소멸은 COX-2 및 NAG-1과 무관하게 독립적으로 일어남을 의미한다.

또 다른 주요 결과는 상악동암에서 sulindac sulfide에 의한 세포소멸에서 caspase 3와 poly ADP-ribosyl polymerase(PARP)가 관여한다는 것이다. Mitochondria pathway와 관련된 세포소멸의 기전은 cytochrome C가 mitochondria의 intermembrane space에서 분비되어 ATP/dATP, procaspase 9, apoptotic protease activating factor-1과 3차원적 구조를 이룬 후 active caspase 9이 형성된다.[14] 활성화된 caspase 9은 여러 단계를 거쳐 caspase 3 다음 단계의 caspase인 caspase 3를 activation 시킨 후, caspase 3는 핵으로 이동하여 PARP를 활성화시킴으로써 세포소멸이 일어난다.[12] 이에 반하여 Bcl-2나 Bcl-XL은 mitochondrial에서 cytochrome C의 분비를 방해해서 세포소멸이 일어나는 것을 막는다. 그러나 Bcl-2 family 중에서 proapoptotic member인 Bid나 Bax는 mitochondrial에서 cytochrome C의 분비를 촉진시켜 세포소멸을 증가시킨다.[14] 또한 caspase(s)의 억제제인 Z-VAD-fmk에 의해 세포소멸이 줄어 든 것은 caspase 3 외에 또 다른 caspase(s)가 관여할 수 있음을 암시한다. 최근에 Ghose 등은 인체 구강암종에서의 primary culture cell에서 selenium에 의해 세포사멸이 유도되는데 Fas가 관여한다고 보고하였다.[15] 또한 두경부의 편평상태암에서 Fas의 발현은 최근 T 임파구와 같이 배양했을 때 세포소멸이 유도한다고 보고되었다.[16] 이러한 Fas-lignad/Fas의 상호작용은 다양한 약물[17]이나 DNA alkylating agent[18]에 의해서 세포소멸이 유도되는 기전들 중에 하나이다. 그러나 상악동암 세포에서는 sulindac sulfide에 의해 Fas 발현의 변화는 없었다(data not shown). 이러한 차이점은 세포소멸과 약제의 종류에 의존적임을 의미한다.

결론적으로 저자들은 NSAID 중 sulindac sulfide에 의한 상악동 암세포의 사멸은 caspase 3에 의존적인 세포소멸을 규명하였다. 향후 세포소멸이 일어나는 신호전달 체계 및 sulindac sulfide를 환자에게 투여함으로써 나타나는 환자의 생존율 등에 대한 연구가 필요하며, 이를 통해 상악동암의 분자의학적 치료법 개발에 필요한 새로운 표적의 제시에 중요한 자료가 될 것이다.

중심 단어 : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs · Sulindac · 세포소멸 · Caspase.

■ 감사문

이 연구는 2001년 연세대학교 의과대학 교수연구비(2001-09)에 의해 이루어 졌음.

REFERENCES

1) Kim SY, Chu KC, Lee HR, Lee KS, Carey TE. *Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. Acta*

Otolaryngol 1997;117:775-84.

2) Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T. *Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review. Cancer 2001;92:3012-29.*
3) Williams CS, Mann M, DuBois RN. *The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer, and development. Oncogene 1999;8:7908-15.*
4) Ahnen DJ. *Colon cancer prevention by NSAIDs: what is the mechanism of action? Eur J Surg 1998;582S:111-4.*
5) Prescott SM, Fitzpatrick FA. *Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. Biochim Biophys Acta 2000;1470:M69-M78.*
6) Lim JT, Piazza GA, Han EK, Delohery TM, Li H, Finn TS, et al. *Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. Biochem Pharmacol 1999;58:1097-107.*
7) Han EK, Arber N, Yamamoto H, Lim JT, Delohery T, Pamukcu R, *et al. Effects of sulindac sulfide and its metabolites on growth and apoptosis in human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines. Breast Cancer Res Treat 1998;48:195-203.*
8) Franke TF, Kaplan DR, Cantley L. *PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell 1997;88:435-7.*
9) Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. *Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:681-6.*
10) Shiff SJ, Qiao L, Tsai L-L, Rigas B. *Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibiting proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. J Clin Investig 1995;96:491-503.*
11) Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. *Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. Science (Wash. DC) 2000;290:989-92.*
12) Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. *Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-superfamily member that has proapoptotic and antitumorrigenic activities. Mol Pharmacol 2001;59:901-8.*
13) Kim KS, Baek SJ, Flake GP, Loftin CD, Calvo BF, Eling TE. *Expression and regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) in human and mouse tissue. Gastroenterology 2002;122:1388-98.*
14) Gross A, McDonnell JM, Kormeyer SJ. *Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev 2000;13:1899-911.*
15) Ghose A, Fleming J, El-Bayoumy K, Harrison PR. *Enhanced sensitivity of human oral carcinoma to induction of apoptosis by selenium compounds: Involvement of mitogen-activated protein kinase and Fas pathways. Cancer Res 2001;61:7479-87.*
16) Gastman BR, Atarashi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Babinowich H, *et al. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinoma of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. Cancer Res 2000;59:5336-64.*
17) Davis RJ. *The biochemistry of apoptosis. Nature (Lond.) 2000;407:770-6.*
18) Kolbus A, Herr I, Schrieber M, Debatin K-M, Wanger EF, Angel P. *c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. Mol Cell Biol 2000;20:575-82.*